

## ⑪ 公開特許公報 (A) 平1-171489

⑤Int.Cl.	識別記号	序内整理番号	③公開 平成1年(1989)7月6日
C 12 N 15/00		A-8412-4B	
A 61 K 39/205		7252-4C	
C 07 H 21/04			
C 12 P 21/02		C-6712-4B	
//(C 12 P 21/02		C-	
C 12 R 1:91)			
(C 12 P 21/02			
C 12 R 1:865)		C-	
			審査請求 未請求 発明の数 1 (全18頁)

④発明の名称 狂犬病ウイルス糖蛋白質をコードする遺伝子断片およびこれを用いた狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法

②特願 昭62-330896

②出願 昭62(1987)12月26日

⑦発明者 坂本信一 熊本県菊池郡西合志町須屋2033-11  
 ⑦発明者 井手敏雄 熊本県菊池郡西合志町須屋2738-64  
 ⑦発明者 時吉幸男 熊本県熊本市若葉3丁目14-19  
 ⑦発明者 山元通孝 熊本県菊池郡合志町栄2127-20  
 ⑦出願人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大窪668番地  
 ⑦代理人 弁理士筒井知

## 明細書

## 1. 発明の名称

狂犬病ウイルス糖蛋白質をコードする遺伝子断片およびこれを用いた狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 狂犬病ウイルスの糖蛋白質をコードする下記の塩基配列、もしくはこれと等価の塩基配列の全部、またはその一部を含む遺伝子断片。

10	20	30	40	
ATGGTTCCGC	AAGCTCTTCT	GCTTGTACCC	ATTCTGGTT	
50	60	70	80	
TTTCCTCGTG	TTTCGGGAAA	TTCCCTATT	ACACGATAAC	
90	100	110	120	
AGACACACTT	GGTCCCTGGA	GCCCCATCGA	TATACATCAT	
130	140	150	160	
CTCAGTTGCC	CAAACAATT	GGTTGTAGAG	GACGAAGGAT	
170	180	190	200	
GCACCAACCT	CTCAGGGITC	TCCTACATGG	AACTTAAACT	
210	220	230	240	
TGGACACATC	TCAGGCCATAA	AGGTGAACGG	GTTCACTTGC	
250	260	270	280	
ACAGGGCTTG	TAACAGAGGC	AGAACCTAC	ACTAACTTTG	
290	300	310	320	
TTGGTTATGT	CACCAACACT	TTCAAAAGAA	AGCATTCCG	

330	340	350	360
CCCCAACACCA	GATGCTTGT	GAGCTGGCTA	CAACTGGAA
370	380	390	400
ATGGCCGGTG	ACCCCAGATA	TGAAGAGTCT	CTACACAGTC
410	420	430	440
CGTACCCCTGA	CTACCATTTGG	CTTCGAAC	TAAAAACAC
450	460	470	480
AAAGGAGTCC	CTCGTTATCA	TATCTCCAAG	TGTGGTAGAT
490	500	510	520
TTGGACCACAT	ATGACAACTC	CCTTCAC	ACGGCTCTCC
530	540	550	560
CTAGCGGAA	GTGCTCAGGA	ATAACACTAT	CTTCTGTCTA
570	580	590	600
CTGCTCAACT	AACCACGATT	ACACCGTTG	GATGCC
610	620	630	640
AGTCTGAGAC	TAGGGACATC	TTGTGACATT	TTTACCAATA
650	660	670	680
GTAGAGGGAA	GAGAGTATCC	AAGGGGAGCA	AGACCTGTGG
690	700	710	720
CTTTGTAGAT	GAAAGAGGCC	TATATAAGTC	TCTAAAAGGC
730	740	750	760
GCATGCAAC	TCAAGTTGTG	TGGAGTTCTG	GGACTTAGAC
770	780	790	800
TTATGGACGG	AACATGGGTC	GCGATGCAGA	CATCAAATGA
810	820	830	840
GACCAAATGG	TGTCCCTCCG	ATCAGTTGGT	TAATCTGCAC
850	860	870	880
GACCTTCGCT	CAGATGAAT	CGAGCATCTT	TTTATAGAGG

890	900	910	920	1450	1460	1470	1480
AGTTGGTCAA	GAAAAGAGAG	GAGTGTCTGG	ATGCATTAGA	AGAAAAGTCG	ATCGGCCAGA	ATCTACACAA	CCGAGTCCTCA
930	940	950	960	1490	1500	1510	1520
GTCCATATA	ACCAACCAACT	CACTGAGTT	CAGACGTCTC	GAGGGACACGG	AAGGAATGTG	TCAGTCACCT	CCCAAAGCCG
970	980	990	1000	1530	1540	1550	1560
AGTTATTTAA	GAAAACCTTG	CCCCGGGTT	GGAAAAGCAT	GAAATTCTATA	CCTTCATGGG	AGTCGTATAA	AAGTGGGGT
1010	1020	1030	1040	1570			
ATACCATT	CAACAAGACC	TTGATGGAGG	CTGAAGCTCA	GAGACTGGAC	TGTGA		
1050	1060	1070	1080				
CTACAACTCA	GTCAGGACTT	GGAATGAGAT	CATCCCCTCA				
1090	1100	1110	1120				
AAAGGATGTT	TGAGAGTTGG	AGGGAGGTGT	CATCCTCATG				
1130	1140	1150	1160				
TAAACGGGGT	TTTTTCAAT	GGTATAATAT	TAGGGCCTGA				
1170	1180	1190	1200				
CGGTCTATGTT	TTAACCCAG	AGATGCAATC	ATCCCTCCTC				
1210	1220	1230	1240				
CAGCAACATA	TAGAGTTATT	GGAATCCTCA	GTTATTCCCC				
1250	1260	1270	1280				
TGATGCACCC	CCTTGCAGAC	CCGTTCACAG	TTTTCAAGGA				
1290	1300	1310	1320				
CGGGCATGAG	ACTGAGGATT	TTATAGAACT	TCACCTTCCC				
1330	1340	1350	1360				
GATGTCCACG	AACAAGTCTC	AGGGGTGAC	CTGGGTCTCC				
1370	1380	1390	1400				
CGAACTCGGG	GGAGTATGTA	TTACTAACTG	CAGGGACCTT				
1410	1420	1430	1440				
GATTGCCTTG	ATGTTGATAA	TTTCTAAAT	GACATGTTGT				

本発明は、狂犬病のワクチンや診断試薬に有効な狂犬病ウイルス糖蛋白質に関するものであり、さらに詳細には、狂犬病ウイルスの糖蛋白質をコードする遺伝子断片、およびこの遺伝子断片を用いて発現された組換え狂犬病ウイルス糖蛋白質、さらにその狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法に関する。

#### 発明の背景

狂犬病は最も古くから人類に知られていた病気の一つであり、全ての哺乳動物について、感染発症した場合には、ほぼ100%死亡するという極めて危険な人畜共通传染病である。

我が国は島国であるという好条件に恵まれたことと、本病の人への主たる伝播者である犬を対象に狂犬病予防法が制定され毎年予防注射が実施されてきたことにより、1957年にはついに本病の根絶に成功した。以来、今日まで1/4世紀以上の長期間にわたり、本病の発生のない、世界でも数少ない狂犬病撲滅国となっている。しかしながら、わが国のように狂犬病の根絶された国は珍しく、

世界にはまだ流行が続いている。1982年のWHOの統計によるとベトナム、タイ、フィリピン、インド、ブラジルおよびエクアドルなどにおいて狂犬病の流行が多く、インドだけでも年間5万人に及ぶ狂犬病の死者がいると推測されている。また、日本においても、狂犬病の問題は完全に無くなつたわけではなく、東南アジアを中心とした海外渡航者等にとって、狂犬病に対するワクチン接種は依然として重要な予防接種として取り扱われている。

狂犬病ワクチンを歴史的に振り返ると、フランスのバスツール研究所による減毒ワクチンに始まり、その後哺乳動物の脳を材料とした不活性ワクチンやそれらの部分精製ワクチンへ、さらに哺乳動物や鳥類の培養細胞を用いた細胞培養によるワクチンへと改善されてきている。しかしながら、これらはいずれもいわゆる第一世代ワクチンであり、安全性及び生産性等においてまだ問題を残している。

今日の日本における、狂犬病撲滅に大きく貢献

した動物用及び人体用のワクチン株は、西ヶ原株（系）と呼ばれる株であり、このウイルス株は、フランス国バスツール研究所で作出された狂犬病ウイルスバスツール固定毒が家兎繩代における潜伏期が5~6日であったものを、日本国農務省西ヶ原獣疫調査所に於て、近藤らが幼若モルモットと家兎を交互に繩代し、繩代数約90代で潜伏期を当時最短の3~4日に短縮させたものである。（獣疫調査所研究報告第1号 大正7年(1918年)11月発行）。

また、これまでに知られている他の狂犬病ウイルス株としては、ERA株、CVS株、PV株等が代表的なウイルス株として挙げられる。これらの狂犬病ウイルスは、共通した構造として、L, G, N, M1, M2の5つの蛋白質より構成されていることが確認されており、今日においては、これらのウイルス構成蛋白質の中で、糖蛋白質であるG蛋白質が有効なワクチン材料となることが知られている〔Viktorら、J. Immunol. 110, p269-278 (1973)〕。最近、狂犬病ウイルスの各々

の構成蛋白に対するモノクローナル抗体が作出され、これまで明らかでなかった狂犬病ウイルス株間の比較が可能となってきている。FLAMANDら（J.Gen.Viro., 48, 105~109(1980)）は、数多くの狂犬病ウイルスの中和抗体産生能や感染防御に関与しているG蛋白質をモノクローナル抗体を用いて比較し、G蛋白質に対する抗原決定基が少なくとも14種以上あることや、これらの一連の反応パターンから狂犬病ウイルス株間の区別が可能であることを示している。その後、多くの研究者がN蛋白に対するモノクローナル抗体の一連のパネルを用いて世界各地で分離された街上毒ウイルスの抗原性を調べた。その結果、分離地域や分離動物ごとにウイルスの抗原性状が異なっている場合の多いことが分かっている。このような事実はある意味では、一つのワクチン株で世界中の狂犬病を予防し得るかという点に重大な問題を提起していると言えるが、本発明における狂犬病ウイルス株は西ヶ原株に由来し、先にも述べたように、我が国の狂犬病根絶という歴史的事実によりその

優位性が証明されているものである。

#### 従来技術

これまでに、遺伝子組換え技術を用いた狂犬病ウイルス蛋白質の発現に関しては、G蛋白質を標的にしたものを中心として、既にいくつか報告されている。例えば、L.T. Lavenceらは、狂犬病ウイルスERA株の糖蛋白質をコードする遺伝子を大腸菌(*Escherichia coli*)の発現系に導入しその発現を試みている。その結果、糖蛋白遺伝子は大腸菌内で発現はしたもの、宿主が大腸菌であるために糖鎖の付加はなく、免疫原として有効な抗原は得らなかったことを報告している〔Vaccine 84, p203-208 ゴールド・スプリング・ハーバー研究所(Cold Spring Harbor Laboratory)編〕。また、同様に大腸菌を用いての狂犬病ウイルス糖蛋白質発現実験が、E. Yelvertonらによても報告されている〔Science Vol. 219 p841-819 (1983)〕。この報告においても、ワクチンとして有効な抗原が得られたような結果は示されていない。その後、さらに進んで、真核細胞である酵母や動物

細胞を用いてG蛋白の発現を行った例が特許公表公報として報告されている（特許公表公報昭61-500849）。この報告においては、糖鎖が付加したG蛋白質が発現されたことが記載されているが、実際に動物を用いて免疫試験を行った結果等は示されていない。

上記の報告のように、G蛋白質の発現にはいくつかの報告において成功しているものの、実用化レベルにおけるこれらを用いた有効な狂犬病ワクチンが開発された例はまだ報告されていない。

#### 発明の目的

このような状況において、本発明者らは、現存の第1世代の狂犬病ワクチンに優る、遺伝子組換え技術を応用した安全かつ有効なワクチン開発を目的とし、鍛錬探究を重ねた結果、目的の狂犬病糖蛋白質を遺伝子組換え技術により得ることに成功した。すなわち、狂犬病ウイルス西ヶ原株に由来するウイルス株のG蛋白質をコードするcDNAをクローニングし、これを真核細胞用発現ベクターに組込み、真核細胞内で発現させたところ、

真核細胞に目的の狂犬病ウイルス糖蛋白質を発現させることに成功し、さらに発現された糖蛋白質がワクチンとして有効であることを確認し本発明を完成するに至った。さらに本発明における遺伝子組換え技術を用いた狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法によれば、目的の糖蛋白質は、形質転換細胞の細胞膜に結合した状態ではなく、細胞質内に局在する状態で発現され、形質転換細胞の代謝にほとんど影響を及ぼすことなく、効率的に目的の糖蛋白質を発現させ、さらにこれらを容易に精製することが可能となる。このようにして得られた本発明の糖蛋白質は、狂犬病ウイルスを中和する活性を有するモノクロナール抗体と反応するばかりではなく、これを動物に免疫した場合に、狂犬病ウイルス中和活性を有する抗体をも產生させることができ、本発明の糖蛋白質がワクチンや診断試薬の利用に適していることが確認された。

#### 発明の構成および効果

本発明に用いる狂犬病ウイルス株は、前述した西ケ原株に由来し、その後家児細代により安定に

維持され、現在に至るまで培養代数2,000代を越しているウイルス株であり、本明細書中においては、便宜上、N・H株と呼ぶこととする。

本発明の狂犬病ウイルスG蛋白をコードする遺伝子断片(G-cDNA)は、第1図に示した塩基配列のうち、翻訳開始コドンであるATGから終止コドンであるTGAまでの1575塩基対を有する遺伝子断片もしくはこれと等価の遺伝子配列を有する遺伝子断片、またはこれらの遺伝子断片のうち、実質的に抗原決定部位をコードする一部の遺伝子を含む遺伝子である。

本発明のG-cDNAは、狂犬病ウイルスN・H株から、通常の遺伝子クローニング技術【例えば、GublerとHoffmanの方法; Gene 25, p263-269(1983)】を用いることによりクローニングすることができる。このような狂犬病ウイルスN・H株のG-cDNAを組込んだプラスミドを持つ大腸菌は、Escherichia coli DH5 $\alpha$ /pUC-N913:機工研条寄第1631号(FERM BP-1631)として本発明者らにより寄託されている。また、このような

G-cDNAは、第1図の塩基配列を基にDNA合成機器(例:アプライドバイオシステム社製、タイプ381A)を用いて目的の1575塩基対もしくはその一部の必要な遺伝子を合成することにより得ることもできる。このG-cDNAは、適当な発現ベクターに組込み、これを真核細胞に導入することにより目的の狂犬病ウイルスG蛋白を細胞質内に発現させることが可能な遺伝子である。

本発明のG-cDNAを発現させる場合には、その発現宿主として真核細胞が用いられる。真核細胞としては、酵母、または哺乳類動物由来の動物細胞もしくは昆虫細胞由来の培養細胞を用いることが可能である。発現系の構築方法としては、まず、用いた宿主細胞に応じた発現ベクターを構築し、これを宿主細胞に導入することにより目的のG蛋白発現形質転換細胞が得られる。以下、宿主細胞として酵母を用いた場合、培養細胞を用いた場合に応じて、それぞれ詳細に記述する。

酵母を宿主として用いる場合には、酵母の遺伝子と大腸菌の遺伝子を組い、さらに適当なプロモ

ーター領域を組ったシャトルベクターに該G-cDNAを組むことが好ましい。そのようなシャトルベクターとは、酵母の複製開始点、例えば2 $\mu$ oriならびに/もしくはarsI、酵母における選択マーカーとなる遺伝子、酵母由来のプロモーター領域、大腸菌の複製開始点領域(例えばpBR322由来のori領域)、および大腸菌での選択マーカー遺伝子を持つプラスミドである。ここで言う酵母の選択マーカーとは、例えば、ロイシン、ヒスチジン、またはトリプトファン等のアミノ酸産生遺伝子であり、大腸菌での選択マーカーとなる遺伝子とは、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、またはクロラムフェニコール等の耐性遺伝子を指す。酵母由来のプロモーターとは、酵母菌体内で作用することが可能な形質発現調節領域を指し、例えば抑制性酸性 fosfaffärze (PH05) プロモーター、グルタルアルデハイド-3-リン酸脱水素酵素 (GAP-DH) プロモーター等が好ましいものとして挙げられる。このようなシャトルベクターの好ましい一例としては、酸性fosfaffärze

ターゼ形質発現調節領域（プロモーター）を持つpAMB2（特開昭59-36699号）等が挙げられる。宿主の酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22（微研条寄第312号）が好ましいものとして挙げられるが、これに限定されるものではない。

上記のような酵母用発現ベクター（シャトルベクター）を用いて酵母を形質転換させる場合には、通常の酵母形質転換方法〔伊藤ら、J. Bacteriol. 153, p163-168 (1983)〕により、目的のG蛋白発現が可能な形質転換酵母を得ることが出来る。

一方、培養細胞を宿主として用いる場合には、SV40ウイルス遺伝子の一部をG-cDNAと置換することにより、形質転換細胞内でG蛋白を発現することが可能な組換えウイルスを得ることができ、これをヘルバーウィルスとともに宿主細胞に導入し、目的のG蛋白を得ることができる。または、宿主細胞内でプラスミド状態で増殖できるウイルス（バビローマウイルスなど）遺伝子の一部とG-cDNAを結合させ宿主細胞に導入す

れば、プラスミド状態でG蛋白目的遺伝子を発現する細胞を得ることができる。さらに、大腸菌プラスミドにおいてG-cDNAの上流にウイルスや高等動物由来のプロモーターを結合させたプラスミドを培養細胞に導入すれば、宿主染色体に組込まれたG-cDNAを得られた形質転換細胞で発現させることができる。このようなプラスミドとしてpSVレベクター（ファルマシア社製）などのように市販のものを利用することもできる。

上記のようにして得られたG蛋白発現形質転換体を下記のように処理することで目的のG蛋白を精製することが可能である。

まず、得られた形質転換体をその細胞に応じた培地と条件のもとに培養することにより目的のG蛋白を形質転換体の細胞質中に発現させる。宿主として、酵母を用いた場合には、超音波もしくはガラスピーズやマントンゴーリンのような物理的処理や、または必要に応じ界面活性剤のような化学的処理も加えて処理することにより集めた菌体を破壊する。一方、培養細胞の場合には、酵母の

場合のような激しい処理は必要とせず、界面活性剤で処理することにより細胞質内のG蛋白を溶出することができる。このようにして得られた破碎液（ライセート）は、遠心分離等により宿主細胞由来の沈澱物を除いた後、狂犬病G蛋白に対する抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより目的のG蛋白質を容易に精製することができる。さらに精製を行う場合には通常の精製方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離等のアフィニティクロマトグラフィー等によりワクチンとして使用可能な純度まで精製することができる。

本発明に於ける狂犬病ウイルスG-cDNA及びこれを用いて発現された組換え狂犬病G蛋白質との発現系は、従来報告されたものに比較し、次の特徴を有するものである。

#### (1) 糖蛋白質（G蛋白）cDNAの塩基配列

これまでいくつかの狂犬病ウイルスのcDNA塩基配列が報告されているが、狂犬病ウイルス成熟蛋白質のなかの成熟G蛋白の相補的なDNA（

cDNA）の塩基配列は、1515塩基対からなり、506個のアミノ酸をコードしている。本発明の狂犬病ウイルスN-HL株のG-cDNA塩基配列をERA株、CVS株、PV株のそれらと比較すると、これらのいずれとも塩基配列が異なり、特に、糖鎖の付加が予想される Asn-X-Thr(Ser)配列によって示される部位は明確に異なっている。その違いをまとめたものを第1表に示す。

第1表

株名	N末端からのアミノ酸番号						
	37	158	204	247	319	465	480
N-HL	○	×	×	○	○	×	○
ERA	○	×	×	○	○	○	×
CVS	○	×	○	×	○	×	○
PV	○	○	×	○	○	○	×

○：糖鎖の付加が可能な部位

×：糖鎖の付加が不可能な部位

糖の付加（グリコシレーション）の意義はよく解説されていないものの、蛋白質の構造や安定性

に関与していると考えられている。事実、生体の生理活性物質や血清蛋白等多くの蛋白が糖蛋白質である。グリコシレーションシゲナルの配列の存在は必ずしも糖の付加を意味するものとは限らないが、この配列は蛋白質の構造や安定性に関与している可能性が強く、その意味では蛋白質の機能（生物学的活性）に関与することになるので、グリコシレーションサイトを比較することは、cDNA全体のホモロジーを比較することと同等に重要であると考えられる。

### (2) 動物培養細胞系における発現様式

本発明による発現プラスマミドを動物培養細胞、例えばCOS細胞に感染させ、狂犬病ウイルスG蛋白の発現部位を、ウイルスG蛋白抗原を免疫して得たポリクローナル抗体及びウイルスを中和する活性を有するモノクローナル抗体を用いて検索した。

その結果、本発現系では、G蛋白は細胞質内に顆粒として検出され、細胞膜では検出されなかつた。これまで狂犬病ウイルスG蛋白の動物細胞で

の発現様式でそのような現象の報告はなく、従って本発明における上記発現の様式は新規なものである。狂犬病ウイルスと同じラブドウイルス科に属する水泡性口内炎ウイルス(VSV)に関して、Roseらは、VSVのG蛋白cDNAを本発明の発現系とほぼ同様に構築し、その発現様式を報告している[Cell 30, p753-762 (1982)]。この報告によれば、形質転換細胞中で発現された特異抗原は細胞膜に結合した状態にあることが認められている。この事実は、本発明におけるG-cDNA固有の機能が、G蛋白抗原の細胞質内局在を誘導していることを示している。

発現産物が培養液中に放出される系を除けば、外来遺伝子の発現系としては、発現産物が細胞質内に発現され局在する場合と、発現産物が発現された後細胞膜に結合した状態で局在する場合に分けられる。

一般的な現象として、発現産物が細胞膜に結合すると、その宿主細胞の増殖が阻害を受けやすくなること、さらには細胞膜隨伴性の蛋白（糖蛋白）

の精製において、細胞膜成分が目的の蛋白と結合して、品質や回収率に大きな影響を及ぼす等が考えられる。従って、本発明の狂犬病ウイルスG蛋白発現系は、目的のG蛋白を細胞質内に発現させることができるので、このような発現効率や精製における問題を伴わず、目的のG蛋白を非常に効果的に発現させ、さらに精製することが可能である。

### (3) 発現されたG蛋白質による中和抗体の产生

本発明のように、遺伝子組換えにより外来遺伝子を酵母や培養細胞を用いて発現させる場合には、発現されたペプチドが、目的のペプチド（抗原）に対する抗体と反応はしても、すなわち、発現されたペプチドに抗原性はあっても、生物学的製剤としての性質に欠けているという場合が少なくない。これは、宿主として用いる細胞において、翻訳された後のペプチドが生物活性を持つように修飾されるかどうかによるものと思われる。前にも示したように、E. Yelvertonらは、大腸菌(E. coli)を用いて、狂犬病G蛋白の遺伝子を発現させ

ることに成功し、これがG蛋白質に対する抗体と反応することは確認できたが、これを動物に免疫した場合には抗体を産生させることはできなかつたことを報告している。このことは大腸菌に糖鎖を付ける等の修飾機能がないことが最も大きな原因であると推察されるが、真核細胞である酵母や、培養細胞を用いた場合にも発現物質の生物的活性に関する同様の問題が生じることが少くない。これは、発現されるペプチドが宿主細胞に対してどの様な影響を与えるか、または、発現されたペプチドが本来の生物活性を有するように修飾されるかどうかというよう様々な要素が係わるものと推測され、言い替えれば、発現を目的として宿主に導入される目的ペプチドの構造遺伝子に応じて微妙に影響を受けるものであると言えよう。しかしながら、本発明のG-cDNAを真核細胞に導入し発現され、得られるG蛋白は、G蛋白に対する抗体と反応するだけでなく、これをワクチンとして動物に注射した場合に狂犬病ウイルスに対して中和活性のある抗体を誘導することが可能で

あることが、モルモットを用いた免疫試験により確認された。さらにその免疫原性の強さを狂犬病ウイルス由来の精製G蛋白質と比較したところ、同等の結果を示した。このことは、本発明のG蛋白がワクチンとして十分に有効であることを示しており、遺伝子組換えにより安価でしかも大量に調製されることが可能な本発明のG蛋白を用いたワクチンが、開発途上国を中心とした狂犬病の蔓延に大いに貢献し得ることを示している。

このように、本発明の特徴は、狂犬病ウイルスG蛋白質を細胞膜に結合させず細胞質にのみ局在させ発現させることが可能であること、またこのようにして得られた狂犬病G蛋白質はウイルスに対する中和抗体を産生させることができるという点にある。

以下、実施例に従って、本発明をさらに詳細に説明する。

各実施例において特に断わりがない限り以下の試薬および方法に従った。

#### 試薬および化学物質

ing [T.Maniatis, p150-163 (1982)]に従い行ったが、特にアガロースゲルより特定のDNA断片を抽出したい時には、ローメルティングアガロース(BIO-RAD カタログ番号 162-0017)を使用し、その回収もMolecular cloning [T. Maniatis, p170 (1982)]に従い行った。

#### プラスミドの抽出・精製

形質転換した大腸菌から大量にプラスミドを抽出・精製する場合はMolecular cloning [T. Maniatis, p90-91 (1982)]記載のアルカリ法に従い行った。形質転換後の数多くの大腸菌の中から、所望のプラスミドで形質転換したクローンを選定する場合、次に、述べるコロニーハイブリダイゼーションに従い目的の陽性クローンをまず選択した。そのクローンから小量のプラスミドを抽出・精製する方法としてMolecular Cloning [T. Maniatis P368 (1982)]に従い、それを抽出し所定の制限酵素で切断しアガロース電気泳動によりその分析を行った。

#### コロニーハイブリダイゼーション・ブラークハ

制限酵素および修飾酵素は宝酒造株式会社および東洋酵素株式会社のものを使用した。

$\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTPはアマシャム(コードNO.P810385、800Ci/mmol)を使用した。

#### DNAの切断・修飾およびライゲーション

各酵素の使用条件はパンフレット "Takara Reagents for Genetic Engineering Research" 及び "TOYOBO 遺伝子工学研究用試薬総合カタログ" の指定する条件に従った。各酵素反応終了後は、Molecular cloning [T. Maniatis p458-459, (1982)]に従い、フェノール処理、クロロホルム処理を行いエタノール沈澱によりDNAを回収した。DNAライゲーション反応は、タカラライゲーションキット(宝酒造、カタログ番号8021)を使用し、それに添付のプロトコールに従い行った。また、DNA末端へのリンカーの付加もこのキットを使用し、それに添付のプロトコールの指示する方法により行った。

#### アガロース電気泳動によるDNA断片の回収

DNAアガロース電気泳動は Molecular clon

#### ハイブリダイゼーション

G-cDNA断片をニックトランスレーショントリプキット(BRL カタログNo.8160SB)と、標識する基質としてビオチン-11-UTP(BRL カタログNo.9507SA)を用い、キットに添付されているプロトコールに従いプローブを調製した。コロニーハイブリダイゼーションの条件等は藤多等が細胞工学 Vol.4, No.10, P893-900, (1985)で述べている方法に準じて行なつた。

#### 実施例1: G-cDNAの調製

##### (1) RNAの抽出

37°C、48時間増殖させたハムスター肺細胞(HmL u細胞)に、moi 0.2で狂犬病ウイルスN-HL株を感染させた。48時間後に、その細胞より全RNAをMolecular Cloning [T. Maniatis, p196 (1982)]に従い、抽出した。

分光的な定量法(260nmの吸光度が1.0の時、40μg/ml)により、ローラーポトル1本分の狂犬病ウイルス感染細胞より1.5mgのRNAを得た。このようにして得たRNAが分解していないことを

確認するために、その中から2μgを取りP.Tomasの方法 [Pro N.A.S. 77 p5201-5205 (1980)]に従い、電気泳動を行った。その結果、その中の大部分は28s及び18sリボソームRNAであったが、それらが分解を受けていなかつたことから、その中に少量含まれるG-mRNAも分解を受けていないことが予測された。

次に、P.Tomasの方法に従い電気泳動を行ったRNAをニトロセルロース (Schleicher & Schuell BA85) にトランスファーし、<sup>32</sup>Pで標識した狂犬病ウイルスHEP-Flury株Gタンパク質cDNA断片をプローブとしてニトロセルロース上でハイブリダイゼーション（ノーザンアロウティング）を行なつた。その結果、同時に泳動したウイルス非感染HmL u細胞から抽出したRNAには、全くバンドを見いだせず、ウイルス感染細胞から抽出したものには2.2kbp付近、およびこれの幾分高分子の位置にバンドを見出すことができた。以後、このRNAをcDNA合成に供した。

#### (2) 狂犬病ウイルスN・HL株のGタンパク質cD

#### NAのクローニング

cDNA合成は、GublerとHoffmanの方法 [Gene 25, p263-269 (1983)]、つまりオリゴdT<sub>12-18</sub>（ファルマシア社製）をプライマーとし、ウイルス感染細胞から抽出したRNA 5μgを雰囲気として、逆転写酵素 (Molony murine Leukemia Virus Transcriptase; BRL社製)により合成した一本鎖cDNAとハイブリダイズしているRNA鎖に、大腸菌RNaseHによってニツクを導入し、それで形成させたRNA鎖をプライマーとして、大腸菌ポリメラーゼIにより二本鎖cDNAを合成した。このようにして合成した二本鎖cDNAを次の2つの方法によりクローニングした。

① 宝酒造ライゲーションキットを用い、両端にpSallリンカーを付加した2本鎖cDNAと、制限酵素Sal Iで切断後、その5'末端のリン酸を除去したクローニングベクターpUC19の両者を宝酒造ライゲーションキットの添付プロトコールに従い反応(16°C、30分間)させた。これをBRLから市販されているDH5α (F<sup>-</sup>、endA1、hsdR17 (r

k<sup>-</sup>、mkt<sup>-</sup>)、supE44、thi-1、λ-recl<sup>-</sup>、gyr96、relA1、φ80dlacZΔM15)のコンビテントセルに感染させた。次に、狂犬病ウイルスヘップラリー(HEP-Flury)株Gタンパク質cDNA断片をプローブとし、このようにして得られたクローナーのうち約3,000クローナーをコロニーハイブリダイゼーションで調べた結果、1クローナーが発色し、これをpUC-RNSLと命名した。「G蛋白質発現系の構築」の項で述べるような操作を加えたこのcDNAを、COS細胞及び酵母の発現系に導入した。

② 長田ら、実験医学 Vol.4、No.8、87-92(1986)に記載している方法に従い、まず2本鎖cDNA 0.5μgをEcoRI-メチラーゼで処理し、EcoRI切断部位をメチル化後、宝酒造ライゲーションキットによりそのDNAの両端にpEcoRIリンカーを付加した。そのDNAをクローニングする為、既にEcoRIで切断されている入gt10のアームをストラテジーン社 (STRATAGENE) (GT10) より購入し、そのパンフレットに記載されているプロトコール

に従いそれらDNAをライゲーションさせた。次にストラテジーン社より市販されているインビトロパッケージングエクストラクト (商品名:Giga pack puls ストラテジーン社製) 及びそれに添付の宿主菌YCS258、もしくはC600hfIを用いたインビトロパッケージ法によりG-cDNAをクローニングした。总数で約35万個のクローナーを得、そのうち7,000個を1枚のプレートにまき、ブラークハイブリダイゼーションの結果から21個の陽性クローナーを得た。

#### (3) pRNSL全塩基配列決定

G-cDNA断片を得るために、20μgのpRNSLを制限酵素Sal I 50単位と、それに添付のバッファーを用い、37°C、4時間反応させた。そのDNAを1%ローメルティングアガロースにより2つの断片にわけ、2.1Kbpに相当するG-cDNA断片を抽出、回収した。

③ このG-cDNAをより小さく断片化するためには、0.1μg G-cDNAを4塩基認識の制限酵素Bae III、Rsa I、Alu I、Tag I、Sau3A Iで各々6

, 5, 6, 9, 7個の断片に分断した。その断片化 G-c DNA のうち HaeIII, RsaI, AluI 切断 G-c DNA については SmaI で切断した M13mp18 もしくは SmaI と SalI で切断した M13mp19 と、 TaqI 切断 フラグメントは AccI で切断した M13mp18 と、 また Sau3AI 断片の場合には BamH I、 もしくは BamI と SalI でダブルに切断した M13mp19 と各々、 宝酒造 DNA ライゲーションキットで、 ライゲーションさせた。  
② 制限酵素 KpnI と BamH I で切断した pUC-RNSL を宝酒造キロシークエンス用デリーションキット（カタログ No.6030）と、 それに添付のプロトコールに従い、 BamH I 切断部位からデリーションさせ、 その程度の異なる G-c DNA を調製した。 次にこれを SalI で切断した。 このようにして得たデリーション G-c DNA を SmaI と SalI で二重切断した M13mp18 を、 タカラライゲーションキットを用い、 ライゲーションさせた。

東洋纺インストラクションマニュアルの方法に従い、 JM101 のコンピテント細胞を調製し①、 ②の処理で得た DNA でコンピテント細胞を形質転換

させた。 その形質転換の手順およびその後一本鎖 DNA の抽出、 精製はすべて東洋纺 M13 クローニングキット（コード No.M13-001）とその“インストラクションマニュアル”に従い行った。 このようにして得た一本鎖 DNA は、 東洋纺 M13 シークエンシングキット（コード No.M13-003）と BRL 電気泳動装置（モデル S2 カタログ No.1105）を用いた BRL シークエンシングゲル電気泳動システムとそれに添付のプロトコールに従い行った。 その結果、 pRNSL は 2,123 基対 (bp) からなり、 その中にアミノ酸 524 個からなる狂犬病 G 蛋白質をコードする 1,575 基対のオープンリーディングフレームが存在することが確認された（第 1 図参照）。  
塩基配列の結果から、 クローニングした G-c DNA の 5' 末端にはアデニンのクラスターが 32 個存在することがわかった。 それを SV40 後期、 および酵母酸性ホスファーゼプロモーターの下流に接続した場合、 このアデニンクラスターはその転写を著しく阻害することが予想された。 そこで以下に示す手順でそれを除去した。 まず pUC-

RNSL 2 μg を制限酵素 PstI で切断（37°C、 2 時間）した。 その DNA を、 宝酒造スクレアーゼ Ba131-S（カタログ No.2510A）により反応温度 30°C、 反応時間 2 分で 下記の反応組成で消化を行った。

DNA (PstI 切断済)	23 μl
5x Ba131 バッファー（※）	6 μl
Ba131S (2units/ml)	1 μl
(※) 5x Ba131バッファー; 100mM Tris-HCl, 3M NaCl, 80mM CaCl <sub>2</sub> , 60mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM EDTA	

この後、 2 μg pSalI リンカー（東洋纺 SAL-801）を宝酒造ライゲーションキットを用いて、 このスクレアーゼ Ba131 切断 DNA 両端に付加した。 その DNA を制限酵素 SalI で十分切断し、 ローメルティングアガロース電気泳動により約 2.1 kbp 付近のプロードとなった DNA バンドを切り出しその DNA を回収した。 その DNA を制限酵素 SalI で切断した pUC19 とライゲーションキットを用いライゲーションさせ、 BRL（カタログ No.8263SA）より購入したコンピテント細胞 DH5α を

形質転換させることでクローニングを行った。

このようにして得られたクローンの 5' 末端側の塩基配列を東洋纺 M13 クローニングキット（コード No.M13-001）とその“インストラクションマニュアル”に従つて行ない、 それを決定した（第 2 図参照）。 この中で N9-13 を G 蛋白質 cDNA として、 後の COS 細胞、 および酵母の発現系に導入した。 この遺伝子断片を有するプラスミド pUC-N913 は、 大腸菌に組込まれた状態で Escherichia coli DH5α / pUC-N913 [微研条寄第 1631 号 (FERM BP-1631)] として寄託されている。

#### 実施例 2： 動物細胞を宿主とした糖蛋白質の発現

##### (1) COS 細胞発現プラスミドの構築

pUC-N913 を制限酵素 SalI で切断し、 インサートしている G 蛋白質 cDNA を得るために制限酵素 SalI でそれを切断し、 2 つの断片に分けた。 Molecular Cloning [T. Maniatis, 170 (1982)] に記載の方法に従い、 ローメルティングアガ

ロースゲル電気泳動によりG-cDNA断片を得た。発現ベクターとして、ファルマシア社より市販されているpSVL（カタログNo. 27-4509-01）を使用した。G-cDNAをこのベクターのプロモータ下流に挿入する為に制限酵素XbaIで切断し、その5'末端リン酸を除去した。次にpSVLとN9-13G-cDNA断片をタカラライゲーションキットによりライゲーションさせ、それをHB101コンピメントセルに感染させた。

前記“プラスミドの抽出・精製”及び“コロニーハイブリダイゼーション”的項で述べた方法によりN9-13G-cDNAがSV40後期プロモーターの転写の方向に挿入されたものを選定し、その1つであるpSVL-N913（第3図参照）をファルマシア社より市販されているCell Pfect Transfection Kit（カタログNo.17-0595-01）を用いてCOS細胞に感染させた。

#### (2) COS細胞でのG蛋白質発現確認

アフリカミドリザル腎由來SV40形質転換細胞（COS-1）（大日本製薬より入手、カタロ

グNo.09-1650）を、10%牛血清を含むMEM培地中に細胞濃度が $10^5$  cell/mlになるように調整し、37°Cで24時間二酸化炭素フランケン器で培養した。24時間の培養後、培地を除去し、細胞を0.01M PBSで1回洗浄した。50μg/mlIDEAE-デキストラム溶液100μlとG蛋白発現ベクターpSVL-N913 0.5μgを混合したものをこの細胞に滴下し、室温に15分間放置して感染させた。その後、無血清MEM培地を用いてこの細胞を洗浄し、通常の培養条件（37°C、5%二酸化炭素フランケン器）で48時間培養した。

次に、このようにして得た細胞がG蛋白質を発現していることを確認するために、ウイルス学実験法（国立予防衛生研究所学友会編、p297-329）に記載されている方法に従い間接蛍光抗体法により観察を行った。すなわち、DNA感染48時間後の培養上清を除去し、アセトンを滴下することで目的抗原がはげ落ちたり、溶出したりしないよう前処理を行った。一次抗体として、中和抗体を持つモノクロナール抗体と前処理した細胞を反応

させた（10分、室温）。0.01M PBSで洗浄後、蛍光色素であるFITC（fluorescen Isothiocyanate）で標識した抗マウスIgG（FITC-Rbx Mouse IgG(H+L)、ZYME社製カタログNo.81-6511）と反応させた。これを0.01M PBSで洗浄後、蛍光顕微鏡により観察した。このようにして観察したCOS細胞の蛍光反応の状態を第4図に示した。その結果、COS細胞内で発現されたG蛋白質は細胞膜に結合した状態ではなく、細胞質内に顆粒状として発現されていることが確認された。

#### 実施例3：酵母を宿主とした糖蛋白質の発現

##### (1) 酵母発現プラスミドの構築

pUC-N913がインサートしているG蛋白質cDNAを得るため、制限酵素SalIでそれを切断し、2つの断片に分けた。ローメルティングアガロース電気泳動により、G-cDNA断片を得た。一方、酵母での発現ベクターpAM82（特開昭59-36699号参照）を、制限酵素XbaIで切断した。その後、アルカリホスファターゼ（ベーリングガー；製品号703023）を用い5'末端のリン酸をMol-

cular Cloning (T. Maniatis P133-134 1982) に従い除去した。このベクターとN9-13の両者をタカラライゲーションキットを用いライゲーションさせ、これを大腸菌HB101のコンピメントセルに感染させた。出現した大腸菌を、G-cDNAをプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより陽性クローンpAMN913を得た（第5図）。

##### (2) 酵母での糖蛋白質の発現

酵母としてサッカロミセス・セレビシエAH22 [a leu2 his4 Can1 (Cir+) ]（微生物研究会第312号）を用い、これをYPD培地（2%ポリペプトン、1%イーストエキス、2%グルコース）100mlに接種し、30°Cで一晩培養した後、遠心して集菌した。滅菌水20mlにて菌体を洗浄し、ついで1.2Mソルビトール及び100μg/mlチモリアーゼ60,000（生化学工業製）の溶液5mlに懸滴させ、30°Cで約30分間保ち、スフェロプラスト化した。ついで、スフェロプラストを1.2Mソルビトール溶液で3回洗浄した後、2Mソルビトール、10mM CaCl2および10mM Tris-HCl

(pH7.5) の溶液0.8mlに懸濁させ、その60μlずつを小試験管に分注した。これに前に調製した粗換えプラスミドpAMN913 (10μg) を加えて、充分混合し、さらに0.1M CaCl<sub>2</sub> (3μl) 加えて最終濃度10mM CaCl<sub>2</sub> とし、室温に5~10分間放置した。ついでこれに、20%ポリエチレンギリコール4,000 0、10mM CaCl<sub>2</sub> および10mM Tris-HCl (pH7.5) 溶液1mlずつを加えて混合し、室温に約20分間放置した。この混合液0.2mlずつを45℃に保溫された再生培地 (22%ソルビトール、2%グルコース、0.7%イーストニトロゲンベースアミノ酸、2%YPD、20μg/mlヒスチジン、3%寒天) 10mlに加え、軽く混合させ、予め準備された1.2Mソルビトール含有最小培地 (0.7%イーストニトロゲンベースアミノ酸、2%グルコース、20μg/mlヒスチジン、2%寒天) プレートに重層し、固化させた後、30℃で培養してロイシン非要求性酵母のコロニーを得た。このコロニーを20μg/mlヒスチジンを含むバルクホルダーミニマムメディウム【東江ら; J.Bacteriol., 113, 117~738(1973)を参照】にて培養して形質転換母サッカロミセス・セレビシエを得た。

このようにして得られた形質転換母のコロニーをさらに20μg/mlヒスチジンを含むバルクホルダーミニマムメディウムの寒天プレート上に塗布し、30℃にて培養してコロニーを形成させた(ロイシン非要求性となった形質転換体の再確認のため)。ついでこのコロニーから菌体を分離し、20μg/mlヒスチジンを含むバルクホルダーミニマムメディウム10mlに接種し、30℃にて培養を行う。約24時間後、対数増殖期にある菌体を遠心して集菌し、これをリン酸を含まない最小培地 (バルクホルダーミニマムメディウムに含まれるKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>をKClで置換し、さらに20μg/mlヒスチジンを加えたもの) 10mlに菌体数約4×10<sup>6</sup>個/mlになるように懸濁し、30℃にて約24時間培養を続けたのち、400回転、10分間の遠心により菌体を集めめた。

この菌体を1.2Mソルビトール、50mMリン酸緩衝液 (pH7.2)、14mM2-メルカプトエタノール、100μg/mlサイモリエース60,000の溶液3mlに懸濁させ、30℃にて30分間ゆるやかに振とうしてスフ

エロプラスト化し、遠心分離によりこれを集めた。このスフェロプラストを1%トリトンX-100を添加した50mMリン酸緩衝液 (pH7.2) 1mlに懸濁し、グラスピースを加えて撲はんして菌体を破碎した。この破碎液を5000rpmで10分間遠心し、上清について次のG蛋白測定法によりG蛋白抗原活性を測定した。即ち、第1抗体として、抗G蛋白モノクローナル抗体を50mM炭酸緩衝液 (pH9.5) で希釈し、ELISA用96穴プレートに37℃、2時間もしくは室温4時間コートした。次にPBS (リン酸緩衝生理食塩水) / 0.05% Tween20溶液 (PBS-Tween) で3回洗浄し、1%BSAを含むPBS-Tween (BSA-PBS-Tween) で4℃一夜マスキングした。ついで、各々のサンプルをPBS-Tweenで適当に希釈しプレートに分注し、37℃、1時間保溫した。その後、PBS-Tweenで5回洗浄し、バーオキシダーゼ標識した抗G蛋白モノクローナル抗体を含むBSA-PBS-Tween溶液をプレートに添加した後、37℃、1時間保溫した。その後、PBS-Tweenで5回洗浄し、基質としてTMBZ

(テトラメチルベンジジン塩酸塩) のEDTA溶液 (0.006%過酸化水素) をプレートに添加し、発色させた。発色の程度をオートリーダー (00 450 nm) で測定して、第2表の結果を得た。陰性対照としてG-cDNAを組込んでいないプラスミドpAMB2を用いて形質転換した形質転換母を用いて同様に処理したものについてのG蛋白抗原活性も同時に測定した。

## 第2表

	pAMN913	pAMB2
00450	1.7	0.1

この表から明らかなように、本発明のG-cDNAを組んだシャトルベクターを導入した酵母のみに非常に高いG蛋白抗原活性が検出できた。

### 実施例4: マウスによる免疫原性試験

#### (1) 免疫用抗原の調整および免疫

ウイルス中和活性を有するモノクローナル抗体

をリガンドとしたアフィニティーコロマトグラフイーを用いて、pAMN913で形質転換した酵母のライセートから免疫試験に使用するためのG蛋白質を精製した。これに水酸化アルミニウムゲルを加え、1ドース1μgになるように調整し、免疫用抗原とした。体重450~650gのハートレー系モルモット(雄)20匹を用い、その内10匹に上記で調整した免疫用抗原を頸腔内に注射し、さらに初回注射から1週後に同様に2回目の注射を行った。残りの10匹は非免疫対照群として生理食塩液を同様に注射した。

#### (2) 中和試験

中和用ウイルスはHmLu-1細胞に増殖され、かつ成熟マウスの脳内注射でこれを発症死させ得る毒性を有する狂犬病ウイルスN・H株を用いた。免疫群すべてのモルモットについて、注射前、および2回目注射2週後に採血を行った。非免疫対照群についても同様に採血を実施した。次にこれらの血清を56℃で30分間加熱非凍結を行い、この血清をまず、2倍段階希釈し、その50μlにウイル

ス量が200TCID<sub>50</sub>になるように調整したウイルス液50μlを37℃で90分間反応させた。次にその50μlづつを96穴マイクロプレートに培養させた。HmLu-1胞に接種し、37℃で1.0時間吸を行ったのち、細胞維持用培地(イーグルMEM培地)150μlを加えて37℃で4日間培養を行った。培養後のプレートについて西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish Peroxidase)を標識した抗狂犬病G蛋白モノクローナル抗体(標識抗体)を反応させた。その結果において標識抗体と反応しない血清はウイルス非感染のものであることを示し、中和抗体陽性を示す。このようにウイルス感染を完全に抑えた血清の最高希釈倍数の逆数を求め、これを中和抗体価とした。その結果、本発明のG蛋白を免疫して得られた血清には中和抗体を有することがわかった。その結果を第3表に示した。

以下余白

第3表

免疫群		非免疫群	
モルモット	中和抗体価	モルモット	中和抗体価
No.	注射前(0w)	No.	注射前(0w)
1	<2	11	<2
2	<2	12	<2
3	<2	13	<2
4	<2	14	<2
5	<2	15	<2
6	<2	16	<2
7	<2	17	<2
8	<2	18	<2
9	<2	19	<2
10	<2	20	<2
(注) 0w:0週目 3w:3週目			

能陽性モルモットとした。その結果を第4表に示した。

第4表

試験群	発症死数	耐過数	感染防御率
免疫群	1	9	90%
対照群	10	0	0%

その結果において本発明の狂犬病G蛋白質を免疫した群では1匹(第3表のNo.6)を除くすべてのモルモットが無症状の経過を示したが、一方の非免疫対照群はすべてのモルモットが狂犬病特有の症状を呈して死亡した。以上の成績より、本発明のG蛋白質が狂犬病のワクチンとして非常に有効であることが確認された。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明者らによりクローニングされた狂犬病G蛋白をコードする構造遺伝子およびそ

#### (4) ウィルス攻撃試験

前記(2)で述べた方法に準じて2回免疫したモルモットを2回目免疫から2週間後(初回免疫から3週目)に、約10LD<sub>50</sub>/0.2mlの狂犬病ウイルスCVS株を口筋内に接種(攻撃)した。対照群に対しても同様に攻撃を行った。攻撃後2週間症状の有無を観察し、無症状に経過したもののが感染防御

の側配列からなる遺伝子配列およびこれから推測されるアミノ酸配列を示したものである。

第2図は、本発明の狂犬病G-cDNAの調整においてアデニンクラスターの除去を示したものである。

第3図は、COS細胞を宿主とした発現ベクター-pSVL-N913の構築図を示す。

第4図は、COS細胞内で発現された狂犬病G蛋白を蛍光反応で示したCOS細胞の形態学的变化を示す写真である。

第5図は、酵母用発現ベクターpAMN913の構築図を示す。

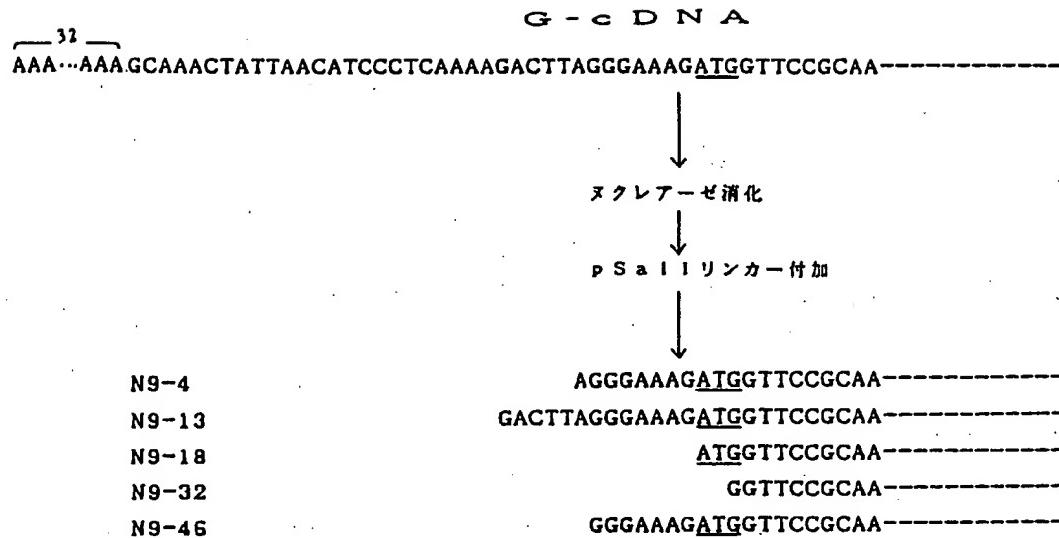
## 第 1 回 その 1

AA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. ACT. ATT. AAC. ATC. CCT. CAA. AAG. ACT. TAG. GGA  
 AAG. ATG. GTT. CCG. CAA. GCT. CTT. CTG. CTT. GTA. CCC. ATT. CTG. GGT. TTT. TCC. TCG. TGT. TTC. GGG  
 Met-Val-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Leu-Val-Pro-Ile-Leu-Gly-Phe-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly  
 AAA. TTC. CCT. ATT. TAC. ACG. ATA. CCA. GAC. ACA. CTT. GGT. CCC. TGG. AGC. CCG. ATC. GAT. ATA. CAT  
 Lys-Phe-Pro-Ile-Tyr-Thr-Ile-Pro-Asp-Thr-Leu-Gly-Pro-Trp-Ser-Pro-Ile-Asp-Ile-His  
 CAT. CTC. AGT. TGC. CCA. AAC. AAT. TTG. GTT. GTA. GAG. GAC. GAA. GGA. TGC. ACC. AAC. CTG. TCA. GGG  
 His-Leu-Ser-Cys-Pro-Asn-Asn-Leu-Val-Val-Glu-Asp-Glu-Gly-Cys-Thr-Asn-Leu-Ser-Gly  
 TTC. TCC. TAC. ATG. GAA. CTT. AAA. GTT. GGA. CAC. ATC. TCA. GCC. ATA. AAG. GTG. AAC. GGG. TTC. ACT  
 Phe-Ser-Tyr-Met-Glu-Leu-Lys-Val-Gly-His-Ile-Ser-Ala-Ile-Lys-Val-Asn-Gly-Phe-Thr  
 TGC. ACA. GGC. GTT. GTA. ACA. GAG. GCA. GAA. ACC. TAC. ACT. AAC. TTT. GTT. GGT. TAT. GTC. ACC. ACC  
 Cys-Thr-Gly-Val-Val-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Tyr-Thr-Asn-Phe-Val-Gly-Tyr-Val-Thr-Thr  
 ACT. TTC. AAA. AGA. AAG. CAT. TTC. CGC. CCA. ACA. CCA. GAT. GCT. TGT. AGA. GCT. GCG. TAC. AAC. TGG  
 Thr-Phe-Lys-Arg-Lys-His-Phe-Arg-Pro-Thr-Pro-Asp-Ala-Cys-Arg-Ala-Ala-Tyr-Asn-Trp  
 AAG. ATG. GCC. GGT. GAC. CCC. AGA. TAT. GAA. GAG. TCT. CTA. CAC. AGT. CCG. TAC. CCT. GAC. TAC. CAT  
 Lys-Met-Ala-Gly-Asp-Pro-Arg-Tyr-Glu-Gly-Ser-Leu-His-Ser-Pro-Tyr-Pro-Asp-Tyr-His  
 TGG. CTT. CGA. ACT. GTA. AAA. ACC. ACA. AAG. GAG. TCC. CTC. GTT. ATC. ATA. TCT. CCA. AGT. GTG. GTA  
 Trp-Leu-Arg-Thr-Val-Lys-Thr-Thr-Lys-Glu-Ser-Leu-Val-Ile-Ile-Ser-Pro-Ser-Val-Val  
 GAT. TTG. GAC. CCA. TAT. GAC. AAC. TCC. CTT. CAC. TCG. AGG. GTC. TTC. CCT. AGC. GGA. AAG. TGC. TCA  
 Asp-Leu-Asp-Pro-Tyr-Asp-Asn-Ser-Leu-His-Ser-Arg-Val-Phe-Pro-Ser-Gly-Lys-Cys-Ser  
 GGA. ATA. ACA. GTA. TCT. TCT. GTC. TAC. TGC. TCA. ACT. AAC. CAC. GAT. TAC. ACC. GTT. TGG. ATG. CCT  
 Gly-Ile-Thr-Val-Ser-Ser-Val-Tyr-Cys-Ser-Thr-Asn-His-Asp-Tyr-Thr-Val-Trp-Met-Pro  
 GAA. AGT. CTG. AGA. CTA. GGG. ACA. TCT. TGT. GAC. ATT. TTT. ACC. AAT. AGT. AGA. GGG. AAG. AGA. GTA  
 Glu-Ser-Leu-Arg-Leu-Gly-Thr-Ser-Cys-Asp-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Val  
 TCC. AAG. GGG. AGC. AAG. ACC. TGT. GGC. TTT. GTA. GAT. GAA. AGA. GGC. CTA. TAT. AAG. TCT. CTA. AAA  
 Ser-Lys-Gly-Ser-Lys-Thr-Cys-Gly-Phe-Val-Asp-Glu-Arg-Gly-Leu-Tyr-Lys-Ser-Leu-Lys  
 GGC. GCA. TGC. AAA. CTC. AAG. TTG. TGT. GGA. GTT. CGT. GGA. CTT. AGA. CTT. ATG. GAC. GGA. ACA. TGG  
 Gly-Ala-Cys-Lys-Leu-Cys-Gly-Val-Arg-Gly-Leu-Arg-Leu-Met-Asp-Gly-Thr-Trp  
 GTC. GCG. ATG. CAG. ACA. TCA. AAT. GAG. ACC. AAA. TGG. TGT. CCT. CCC. GAT. CAG. TTG. GTT. AAT. CTG  
 Val-Ala-Met-Gln-Thr-Ser-Asn-Glu-Thr-Lys-Trp-Cys-Pro-Pro-Asp-Gln-Leu-Val-Asn-Leu  
 CAC. GAC. CTT. CGC. TCA. GAT. GAA. ATC. GAG. CAT. CTT. GTT. ATA. GAG. GAG. TTG. GTC. AAG. AAA. AGA  
 His-Asp-Leu-Arg-Ser-Asp-Glu-Ile-Glu-His-Leu-Val-Ile-Glu-Gly-Leu-Val-Lys-Arg  
 GAG. GAG. TGT. CTG. GAT. GCA. TTA. GAG. TCC. ATC. ATA. ACC. ACC. AAG. TCA. GTG. AGT. TTC. AGA. CGT  
 Glu-Glu-Cys-Leu-Asp-Ala-Leu-Glu-Ser-Ile-Ile-Thr-Thr-Lys-Ser-Val-Ser-Phe-Arg-Arg  
 CTC. AGT. TAT. TTA. AGA. AAA. CTT. GTC. CCC. GGG. TTC. GGA. AAA. GCA. TAT. ACC. ATA. TTC. AAC. AAG  
 Leu-Ser-Tyr-Leu-Arg-Lys-Leu-Val-Pro-Gly-Phe-Gly-Lys-Ala-Tyr-Thr-Ile-Phe-Asn-Lys  
 ACC. TTG. ATG. GAG. GCT. GAA. GCT. CAC. TAC. AAG. TCA. GTC. AGG. ACT. TGG. AAT. GAG. ATC. ATC. CCC  
 Thr-Leu-Met-Glu-Ala-Glu-Ala-His-Tyr-Lys-Ser-Val-Arg-Thr-Trp-Asn-Glu-Ile-Ile-Pro  
 TCA. AAA. GGA. TGT. TTG. AGA. GTT. GGA. GGG. AGG. TGT. CAT. CCT. CAT. GTA. AAC. GGG. GTG. TTT. TTC  
 Ser-Lys-Gly-Cys-Leu-Arg-Val-Gly-Gly-Arg-Cys-His-Pro-His-Val-Asn-Gly-Val-Phe-Phe

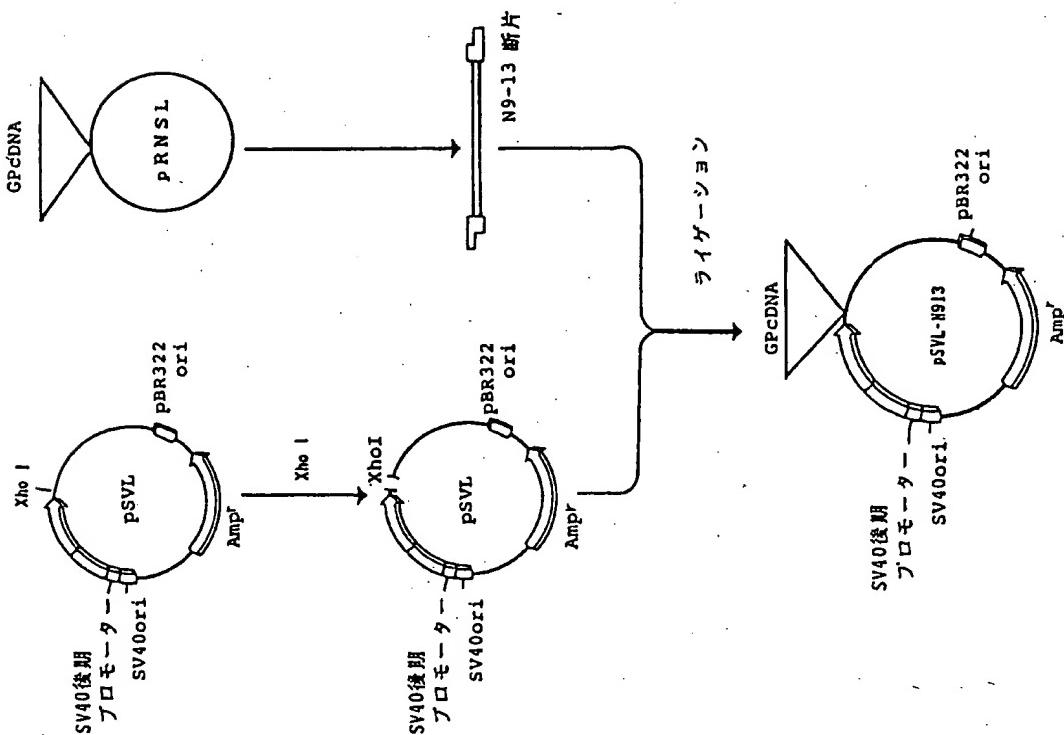
## 第 1 図 その 2

AAT. GGT. ATA. ATA. TTA. GGG. CCT. GAC. GGT. CAT. GTT. TTA. ATC. CCA. GAG. ATG. CAA. TCA. TCC. CTC  
 Asn-Gly-Ile-Ile-Leu-Gly-Pro-Asp-Gly-His-Val-Leu-Ile-Pro-Glu-Met-Gln-Ser-Ser-Leu  
 CTC. CAG. CAA. CAT. ATA. GAG. TTA. TTG. GAA. TCC. TCA. GTT. ATT. CCC. CTG. ATG. CAC. CCC. CTT. GCA  
 Leu-Gln-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Glu-Ser-Ser-Val-Ile-Pro-Leu-Met-His-Pro-Leu-Ala  
 GAC. CCG. TTC. ACA. GTT. TTC. AAG. GAC. GGC. GAT. GAG. ACT. GAG. GAT. TTT. ATA. GAA. GTT. CAC. CTT  
 Asp-Pro-Phe-Thr-Val-Phe-Lys-Asp-Gly-Asp-Glu-Thr-Glu-Asp-Phe-Ile-Glu-Val-His-Leu  
 CCC. GAT. GTG. CAC. GAA. CAA. GTC. TCA. GGG. GTT. GAC. CTG. GGT. CTC. CCG. AAC. TGG. GGG. GAG. TAT  
 Pro-Asp-Val-His-Gln-Val-Ser-Gly-Val-Asp-Leu-Gly-Leu-Pro-Asn-Trp-Gly-Glu-Tyr  
 GTA. TTA. CTA. AGT. GCA. GGG. ACC. TTG. ATT. GCC. TTG. ATG. TTG. ATA. ATT. TTC. CTA. ATG. ACA. TGT  
 Val-Leu-Leu-Ser-Ala-Gly-Thr-Leu-Ile-Ala-Leu-Met-Leu-Ile-Ile-Phe-Leu-Met-Thr-Cys  
 TGT. AGA. AAA. GTC. GAT. CGG. CCA. GAA. TCT. ACA. CAA. CGC. AGT. CTC. AGA. GGG. ACA. GGA. AGG. AAT  
 Cys-Arg-Lys-Val-Asp-Arg-Pro-Glu-Ser-Thr-Gln-Arg-Ser-Leu-Arg-Gly-Thr-Gly-Arg-Asn  
 GTG. TCA. GTC. ACC. TCC. CAA. AGC. GGG. AAA. TTC. ATA. CCT. TCA. TGG. GAG. TCG. TAT. AAA. AGT. GGG  
 Val-Ser-Val-Thr-Ser-Gln-Ser-Gly-Lys-Phe-Ile-Pro-Ser-Trp-Glu-Ser-Tyr-Lys-Ser-Gly  
 GGT. GAG. ACT. GGA. CTG. TGA. AGA. TTT. GTC. ATC. TTT. TCG. ACG. CTT. CAA. GTT. CTG. AAG. ATA. ACC  
 Gly-Glu-Thr-Gly-Leu-\*\*\*  
 TTC. CCT. CTA. AGC. TGG. GGG. GAA. TCT. CTG. AGT. TCA. ATA. GTC. CTC. CTT. GAA. CTC. CAT. TCA. ACA  
 GGG. TGG. ATT. CAA. AAG. TCA. TGA. GAC. TTT. CAT. TAA. TCA. TCT. CAG. TTG. ATC. AAA. CAA. GGT. CAT  
 GTA. GAT. TCT. CAT. AAT. TCG. GGA. AAT. CTT. CTA. GTA. GTT. TCA. GTG. ACC. GAC. AGT. GCT. TTC. ATT  
 CCC. CAG. GAA. CTG. ATG. TCA. AAG. GTT. GTT. GAC. GGG. TCA. AGA. CCG. ATT. TCT. GAT. GAC. TCC. GTG  
 CGT. GGG. CCC. GGA. CAG. AGG. TCA. TAG. TAC. GTC. CCA. TGA. TAG. CGG. ACT. CAG. CAT. GAG. TCG. ATT  
 GAG. AAA. AGT. AAT. CTG. CCT. CCC. ATG. AAG. GAC. ACC. GCC. AAT. AAC. TCA. CAA. TCA. TCT. TGC. ATC  
 TCA. GCG. AAG. TGT. GCA. TAA. TAA. AGG. GGC. TAG. ATC. ATC. TAA. GCT. TTT. CAG. TTG. AGA. AAA  
 AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA.

第2回

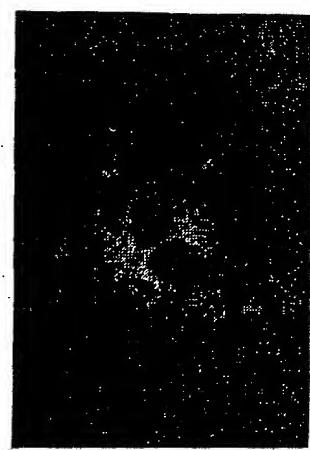


四三

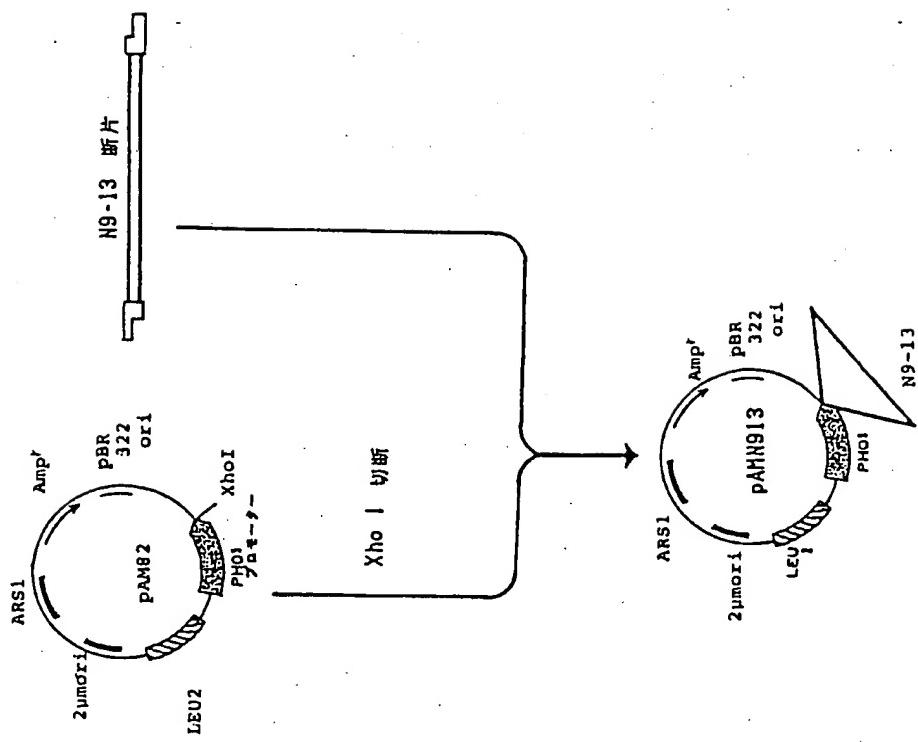


図面の序号

第4 図



第5 図



## 手続補正（方式）

昭和62年4月21日

特許庁長官 小川邦夫殿

## 1. 事件の表示

昭和62年 許願 第330896号

## 2. 発明の名称

狂犬病ウイルス糖蛋白質をコードする遺伝子断片およびこれを用いた狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 熊本県熊本市清水町大庭668番地

名称 財団法人 化学及血液疾患研究所

代表者 野中實男

## 4. 代理人

住所 熊本県熊本市清水町大庭668番地

財団法人 化学及血液疾患研究所内

〒860 電話 096(344)1211

氏名 弁理士(8767) 関井



## 5. 補正命令の日付

昭和63年3月29日(発送日)



## 6. 補正の対象

明細書の図面の簡単な説明の欄、および  
図面(第4図)

## 7. 補正の内容

(1) 明細 第47頁8~10行目、図面の簡単な説明の欄における  
第4図の説明を、次のように補正する。

「第4図は、COS細胞内で発現された狂犬病G蛋白を蛍光  
反応で示したCOS細胞(生物)の形態を示す蛍光顕微鏡写  
真(200倍)である。」

(2) 第4図を別紙のとおり補正する。